

München, 1960

**Die Ausscheidung von
Methylenblau in den Magensaft**

Otto Nehm

[1960]



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM
PHYSIOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT UPPSALA,
UPPSALA, SCHWEDEN

Direktor: Prof. Torsten Teorell, M. D.

Die Ausscheidung von
Methylenblau in den Magensaft

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Otto Nehm
aus Witten-Ruhr

München 1960



5349/60.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. Richard WAGNER
Dekan: Prof. Dr. Herbert SCHWIEGK

Tag der mündlichen Prüfung: 23.2.1960

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Uppsala,
Uppsala, Schweden.

Die Ausscheidung von Methylenblau in den Magensaft.

Von

OTTO NEHM.

Eingegangen am 26. Juni 1958.

Im Jahre 1908 machte FULD die Beobachtung, dass Neutralrot, in den grossen Magen eines Pavlov-Hundes gebracht, auch im kleinen Magen erschien. Seitdem ist in mannigfachen Untersuchungen der Versuch unternommen worden, dieses Phänomen zu erklären.

Einen guten Überblick über die bis 1945 über dieses Thema erschienene Literatur geben KOLM, KOMAROV und SHAY (1945). Es fehlt auch nicht an Versuchen, sich dieses Phänomens, dass Farbstoffe, dem Menschen injiziert, von besonderen Organen, z. B. dem Magen, bevorzugt wieder ausgeschieden werden, für klinische Zwecke zu bedienen. HALLÉN (1948) z. B. beobachtete, dass in einigen Fällen von Hyperazidität die Zeit, in der der Farbstoff (Neutralrot) im Magensaft erschien, kürzer als normal war, während er in Fällen von Achylie überhaupt nicht im Magensaft auftrat.

Verschiedene Autoren wie KOBAYASHI (1935), INGRAHAM und VISSCHER (1935), RAY (1951) sind der Ansicht, dass Faktoren der elektrischen Ladung den Durchgang eines Farbstoffes durch die Zelle bestimmen. Dabei tragen die im Magensaft erscheinenden Farbstoffe ihr Chromogen im elektropositiven Ion, sind also basischer Natur. Sie gehören hauptsächlich zu den Thiazinen, den Oxazinen und den Azinen. Farbstoffe von saurer Natur erscheinen dagegen im Pankreas. MORRISON, REEVES und GARDNER

(1936) geben allerdings an, dass auch saure Farbstoffe im Magensaft erscheinen. Der Gegensatz zwischen ihnen und den oben erwähnten Autoren ist wohl daraus zu erklären, dass beide Autorengruppen verschiedene Methoden für die Stimulierung der Magen-zellen benutzen, die ja die Salzsäure produzieren, sowie auch alle anderen Magendrüsen, die aktiv an der Bildung des Magensaftes beteiligt sind. SHORE, BRODIE und HOGGEN (1957) nehmen eine Lipoidbarriere zwischen Blutplasma und Magen an, durch die nur die undissoziierten Moleküle passieren könnten. Die Ionisationskonstante würde also bei dieser Theorie eine Rolle spielen. KOBAYASHI wies aber schon 1935 darauf hin, dass die Farbstoffausscheidung nicht allein durch Diffusionsfähigkeit oder Lipoidlöslichkeit erklärt werden kann. Dass die Chromophore immer eine — N-Gruppe, als Auxochrome immer eine Amino-, niemals aber eine Sulfogruppe besitzen und dass sie als Farbstoffbasen Salze bilden, schien ihm wichtig. Alle diese angeführten Autoren versuchten, das Problem vom rein qualitativen Standpunkt zu lösen. Diejenigen aber, die quantitativ versuchten, die Farbstoffausscheidung zu bestimmen, scheiterten an den von ihnen angewandten Methoden. Gewöhnlicherweise injizierten sie nämlich Histamin in Form von Bienenwachsdepots, die Farbstoffe wurden intramuskulär gespritzt. Diese Art der Stimulation und der Farbstoffinjektion macht die quantitative Bestimmung der Ausscheidung unmöglich oder erschwert sie mindestens, da Histamin- und Farbstoffkonzentration während der Dauer des Versuches nicht konstant bleiben.

ÖBRINK hat nun 1948 die Kinetik von Neutralrot als dem bis dahin am häufigsten verwendeten Farbstoff studiert. Diese Arbeit ist bis heute die einzige, die das Problem der Farbstoffausscheidung rein quantitativ angeht und die mittels der angewendeten Methodik Ergebnisse liefert, die die Diskussion um die Farbstoffausscheidung wieder in Gang setzen wird.

Die vorliegende Arbeit ist eine Fortsetzung der von ÖBRINK begonnenen Studien über die Kinetik der Farbstoffe im Organismus unter besonderer Berücksichtigung des Magens.

Methodik.

Die meisten Versuche wurden an einem 12 kg schweren Heidenhain-Hund ausgeführt, einige andere an einem 22 kg schweren. Die vom zweiten Hund erhaltenen Ergebnisse können aber, rein qualitativ gesehen, mit denen des ersten verglichen werden.

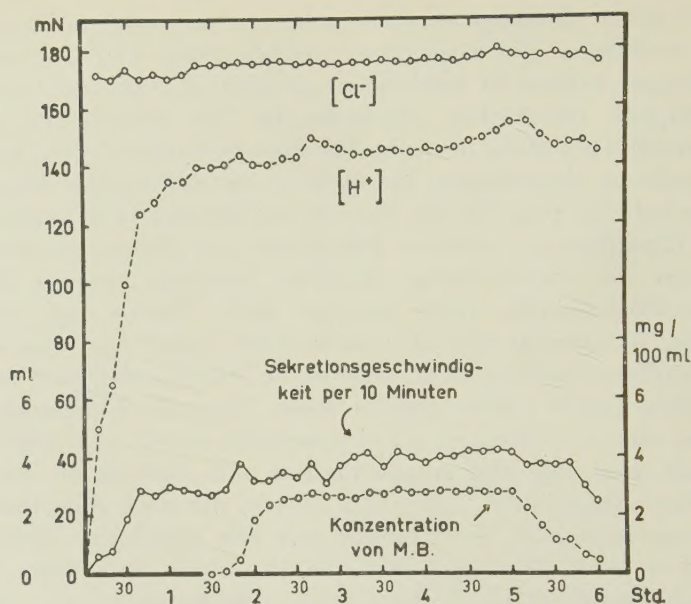


Fig. 1. Ein typisches Experiment mit kontinuierlich intravenöser Injektion von Histamin und Methylenblau. Sobald die Sekretionsgeschwindigkeit konstant war, wurde mit der Injektion von Methylenblau begonnen (1.30 Uhr). Die Injektionen von Methylenblau wurden um 5.00 Uhr beendet, von Histamin um 5.40 Uhr.

Histamin wurde als Histamin-Dihydrochlorid mit Hilfe eines Dauerinjektionsapparates nach ÖBRINK (1948) intravenös injiziert. Methylenblau (MERCK, Nr. 6040, Molekulargewicht: 319.84) wurde in Wasser gelöst, 1 g auf 100 ml, gefiltert und sterilisiert. Die endgültige Stärke dieser Lösung betrug 0.86 %. Um eine konstante Konzentration von Methylenblau (M.B.) im Blute zu gewährleisten, war es nötig, den Farbstoff ebenso wie Histamin mit Hilfe des Dauerinjektionsapparates kontinuierlich intravenös zu injizieren. Dabei wurde folgendermassen vorgegangen: Sobald durch die Histaminstimulation konstante Volumina von Magensaft erhalten wurden, sobald also ein »steady-state« eingetreten war, wurde der Farbstoff injiziert. Der Versuch wurde beendet, oder eine neue Phase des Versuches wurde begonnen, wenn der Magensaft eine konstante Farbkonzentration aufwies.

Der Magensaft wurde durch einen mit einer Art Bürettenhahn versehenen Messzylinder aufgefangen, der durch einen Gummischlauch mit der Silberkanüle des Heidenhainmagens verbunden war. Alle zehn Minuten wurde die Sekretionsrate bestimmt und Proben für die chemische Analyse entnommen.

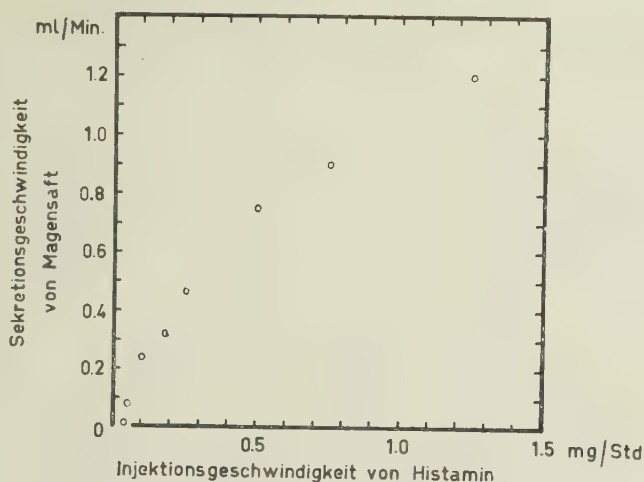


Fig. 2. Der Zusammenhang von Injektionsgeschwindigkeit von Histamin und der Sekretionsgeschwindigkeit von Magensaft.

Die Bestimmung der Säure.

a) Gesamtazidität:

0.1 ml Magensaft wurden 4 ml H_2O und Bromthymolblau als Indikator zugesetzt (pH-Bereich: 6.0—7.6) und gegen 0.01 N NaOH titriert. Die Stärke der Natronlauge wurde jeden Tag mit 0.1 N HCl kontrolliert; als Blindwert wurde die Neutralisation der Natronlauge durch 4 ml H_2O bestimmt.

b) Freie Azidität:

Auf die Bestimmung der freien Säure konnte verzichtet werden, da durch die angewandte Technik mit Histamin der Unterschied zwischen totaler und freier Säure sehr gering war.

Die Chlorid-Bestimmung.

Für die Chlorid-Titration konnten dieselben Proben verwendet werden, die schon zur Bestimmung der Gesamtazidität gedient hatten. Sie wurden jeweils mit 2 ml 0.1 N H_2SO_4 versetzt und dann elektrometrisch mit 0.005 N $AgNO_3$ titriert.

Die Konzentrationsbestimmung von Methylblau im Magensaft.

Da die Absorptionskurven eines Farbstoffes bei verschiedenem pH verschieden sind, d. h. unterschiedliche Absorptionsmaxima aufweisen, war es notwendig, den »isosbestischen Punkt« für M.B. zu bestimmen. Zu diesem Zweck misst man die Absorptionskurven einer gleichen Konzentration von M.B. bei verschiedenen pH-Werten im Beckmann-Spectrophotometer.

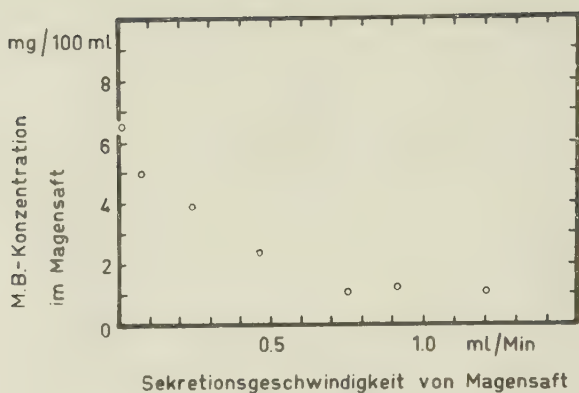


Fig. 3. Der Zusammenhang von Methylenblaukonzentration in Magensaft und der Sekretionsgeschwindigkeit. Methylenblau wurde mit einer konstanten Geschwindigkeit injiziert (1.25 ml/Std.). Jeder Wert stellt einen steady-state Wert dar.

Der »isosbestische Punkt« liegt für M.B. bei 672 $m\mu$.

Die Extinktionswerte der einzelnen Proben wurden mit einem Coleman-Junior-Elektrophotometer bestimmt.

Da M.B. in Leuco-Form ausgeschieden wird, wurden die Proben erst nach 24 Stunden analysiert, um ganz sicher zu sein, dass aller Farbstoff oxydiert worden war.

Ergebnisse.

Mit der ÖBRINKSchen Technik wurden Histamin und M.B. kontinuierlich intravenös injiziert. Die Figur 1 zeigt, dass ein steady-state für die Magensekretion 30 bis 60 Minuten nach Beginn des Versuches erreicht wird. Dann wird M.B. injiziert, das seinen steady-state nach etwa 50 bis 60 Minuten erreicht. Die Injektion von M. B. geschah ausreichend lange, um eine konstante Farbkonzentration im Magensaft zu gewährleisten. Dann wurde der Versuch beendet oder eine neue Phase des Versuches begonnen.

Die Figur 1 zeigt einen leichten Sekretionsanstieg von ungefähr 0.1 ml/Min., nachdem M.B. injiziert worden ist. Diese Beobachtung machten schon KOLM, KOMAROV und SHAY (1945) und ÖBRINK (1948) beim Neutralrot. Ob dieser stimulierende Effekt auf dem Farbstoff selbst, oder auf in ihm enthaltene Unreinheiten beruht, ist nicht ganz klar.

In den acht auf diese Art und Weise durchgeführten Versuchen

wurde die Injektionsdosis für M.B. immer konstant gehalten, diejenige für Histamin aber variiert. Wie die Sekretion von der Histaminzufuhr abhängt, zeigt die Figur 2.

Jedem der in Figur 2 dargestellten Werte entspricht ein solcher für die M.B.-Konzentration. Diese korrespondierenden steady-state Werte von Sekretion und Farbstoffkonzentration werden in Figur 3 graphisch dargestellt.

Die nachfolgende Tabelle stellt alle erhaltenen Werte zahlenmässig zusammen:

Injektions- geschwindigkeit Histamin i. v. mg/Stunde	Magensaft- sekretion ml/Min.	Injektions- geschwindigkeit M. B. i. v. ml/Stunde	Konzentration M.B. im Magensaft mg/100 ml
0.025	0.016	1.25	6.50
0.05	0.078	1.25	5.04
0.1	0.24	1.25	3.97
0.25	0.463	1.25	2.46
0.50	0.754	1.25	1.15
0.75	0.906	1.25	1.37
1.25	1.20	1.25	1.23

Diskussion.

Die Versuche, die rein quantitativ durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass Methylenblau, intravenös injiziert, im Magensaft eines Heidenhain-Hundes erscheint. Mit Hilfe der besonderen Technik konnten sowohl die Konzentration von M.B. im Magensaft wie auch das Sekretionsvolumen selbst in jeder gewünschten Weise konstant gehalten werden. So wurde es möglich, die Beziehungen zu untersuchen, die zwischen Sekretion und Farbstoffausscheidung bestehen. Die Figur 3 zeigt, dass die Konzentration von M.B. im Magensaft sich relativ konstant hält bei mittleren und grossen Sekretionsgeschwindigkeiten, dass sie aber bei kleinen Geschwindigkeiten steil ansteigt.

Dieses Ergebnis steht in völliger Übereinstimmung mit dem, was ÖBRINK (1948) für Neutralrot gefunden hat.

Bei Untersuchungen zur Primäracidität, die LINDE, TEORELL und ÖBRINK (1947) anstellten, ergab sich, dass sie in Abhängigkeit zur Sekretionsgeschwindigkeit und damit zum Sekretionsvolumen steht, d. h., dass sie bei grossen Magensaftvolumina niedrig ist (ungefähr 170 mN), bei geringen und extrem kleinen

aber steil ansteigt. Man ist versucht, diese Kurve für die Primär-azidität mit derjenigen in Figur 3 zu vergleichen. Beide zeigen ungefähr den gleichen Verlauf. Aber ein solcher Vergleich hat Bedeutung nur dann, wenn man weiss, dass die Blutkonzentration in beiden Fällen konstant war. Schon bei den Untersuchungen zur Natur der Ausscheidung von Neutralrot jedoch hatte es sich als ungemein schwierig erwiesen, den Farbstoff im Blutplasma nachzuweisen. Bei der vorliegenden Untersuchung wurde deshalb auf den erneuten Nachweis verzichtet.

Es scheint jedoch mit KOLM *et al.* (1945), ÖBRINK (1948) und RAY (1951) so zu sein, dass infolge der pH-Differenz von Blut und Magensaft eine enorme Akkumulation des Farbstoffes in der Mucosa des Magens Platz greift. Die Interzellularräume sind zwar nicht frei von Farbstoff, er findet sich dort nur in weit geringerer Konzentration.

Dass zwei so chemisch voneinander verschiedene Farbstoffe wie Neutralrot und Methylenblau auf die gleiche Weise ausgeschieden werden, könnte Anlass zur Verwunderung geben. Auf Grund des grossen Akkumulationsgrades von Neutralrot und wahrscheinlich auch von Methylenblau, ist man versucht, an einen besonderen Sekretionsprozess zu denken, der in diesem Falle vorliegen könnte. Ein solcher aktiver Transport würde aber begreiflicherweise auch einen besonderen Transportmechanismus erforderlich machen. Die Affinität zu so verschiedenen Molekülen macht aber eine derartige Annahme zweifelhaft. Nur gleichartige Versuche mit anderen Farbstoffen können hier endgültige Klarheit schaffen.

Dass die in den Magensaft ausgeschiedenen Farbstoffe alle basischer Natur sind, würde für die Existenz einer Lipoidmembran sprechen, die sich zwischen Blutplasma und Magen-zelle befinden würde. Durch sie hindurchdringen könnten nur die undissoziierten Farbstoffmoleküle. Auf der sauren Seite würden sie dissoziieren und damit dann für die Membran impermeabel werden.

Die Tatsache, dass die Farbstoffkonzentration im Magensaft umso grösser wird, je kleiner die Sekretionsgeschwindigkeiten sind, kann wohl mit ÖBRINK (1948) so erklärt werden, dass bei niedrigen Sekretionsgeschwindigkeiten eine vollständigere Extraktion des Farbstoffes von dieser Lipoidmembran auf Grund des längeren Kontaktes zwischen ihr und dem Magensaft stattfindet.

Zusammenfassung.

1. An Heidenhain-Hunden wird die Ausscheidung von Methyleneblau rein quantitativ untersucht.

2. Es wird nachgewiesen, dass die Konzentration des Farbstoffes im Magensaft von der Sekretionsgeschwindigkeit abhängig ist. Die Akkumulationstheorie und die Existenz einer Lipoidmembran versuchen dieses Ergebnis zu erklären.

Summary.

1. Quantitative studies on the elimination of methylene blue through the gastric mucosa were performed on dogs with Heidenhain pouches.

2. It could be demonstrated that the concentration of the dye in the gastric juice depended on the rate of volume secretion. Its accumulation in the gastric juice could possibly be explained by the existence of a lipid membrane through which the dye was eliminated.

Literatur.

- FULD, E. Münch. med. Wschr., 1908. 55. 2264.
 HALLÉN, Lars, Upsala LäkFören. Förh. 1949. 54.
 INGRAHAM, R. C. und M. B. VISSCHER, J. gen. Physiol. 1935. 18. 695.
 KOBAYASHI, K., in Matsuo: *Biologische Untersuchungen über Farbstoffe*. Kyoto. 1935. II. 495.
 KOLM, R., S. A. KOMAROV und H. SHAY, Gastroenterology (Basel) 1945. 5. 303.
 LINDE, S., T. TEORELL und K. J. ÖBRINK, Acta physiol. scand. 1947. 14. 220.
 MORRISON, S., D. REEVES und R. GARDNER, Amer. J. dig. Dis. 1936. 8. 551.
 ÖBRINK, K. J., Acta physiol. scand. 1948, 15. Suppl. 51.
 RAY, F. E. und M. L. JUNG, Brit. J. Cancer 1951. 5. 358.
 SHORE, P. A., B. B. BRODIE und C. A. M. HOGGEN, J. Pharmacol. 1957. 119. 361.

Herrn Prof. Torsten Teorell und Herrn Dozent K.J. Öbrink möchte ich an dieser Stelle herzlich danken für ihre grosszügige Hilfe bei der Anfertigung der Arbeit; ferner Herrn Prof. Richard Wagner für die Übernahme des Referates.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 21.6.1930 als erstes Kind des Fleischermeisters Otto Nehm und seiner Ehefrau Else, geb. Staupe, in Witten an der Ruhr geboren. Volks- und Oberschule besuchte ich in Witten und bestand dort auch im März 1951 die Reifeprüfung.

Im Sommersemester 1951 begann ich in Bethel das Studium der Theologie, studierte dort drei, in Heidelberg zwei Semester.

Mit dem Studium der Medizin begann ich im Sommersemester 1954 an der Universität Marburg, bestand dort 1956 das Physikum. Anschliessend ging ich nach Uppsala an das dortige physiologische Institut, um über die Physiologie des Magens zu arbeiten. In diesem Institut entstand auch die hier vorliegende Arbeit.

Zwei Semester studierte ich dann in Hamburg, vier in München.

Am 7.12.1959 bestand ich das Staatsexamen in München.

